

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-194365

(43)Date of publication of application : 19.07.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/48
A61B 5/15
A61B 5/145
G01N 1/00
G01N 35/02

(21)Application number : 2000-336260

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 02.11.2000

(72)Inventor : KOBAYASHI KOJI
INAGAKI KOJI

(30)Priority

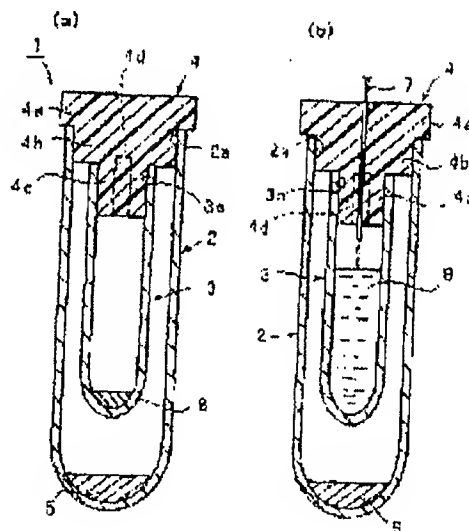
Priority number : 11315406 Priority date : 05.11.1999 Priority country : JP

(54) CONTAINER AND METHOD FOR MEASURING CELL FUNCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cell function measuring container to easily and efficiently prepare a control sample and a sample to be measured from a blood sample in one single container.

SOLUTION: In the cell function measuring container, a second tubular container 3 is disposed inside a first tubular container 2, upper end openings 2a, 3a of the first and second tubular containers 2, 3 are closed by a plug 4, a communication mechanism is constituted by the second tubular container 3 and the plug body 4, the first and second tubular containers 2, 3 are communicated with each other making use of the communication mechanism after the blood sample 8 is introduced in the second tubular container 3, and inverted in the condition. A part of the blood sample flows into a space between the first and second tubular containers 2, 3 from the second tubular container 3, and a stimulant substance 5 to induce the production of the physiologic active substance in the blood sample reacts with the blood sample in the space.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-194365
(P2001-194365A)

(43) 公開日 平成13年7月19日 (2001.7.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	サーチコード(参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	B 2 G 0 4 5
A 6 1 B 5/15		1/00	1 0 1 H 2 G 0 5 8
5/145		35/02	A 4 C 0 3 8
G 0 1 N 1/00	1 0 1		B
35/02			D

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-336260(P2000-336260)

(22) 出願日 平成12年11月2日(2000.11.2)

(31) 優先権主張番号 特願平11-315406

(32) 優先日 平成11年11月5日(1999.11.5)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(72) 発明者 小林 幸司

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

(72) 発明者 船垣 幸司

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

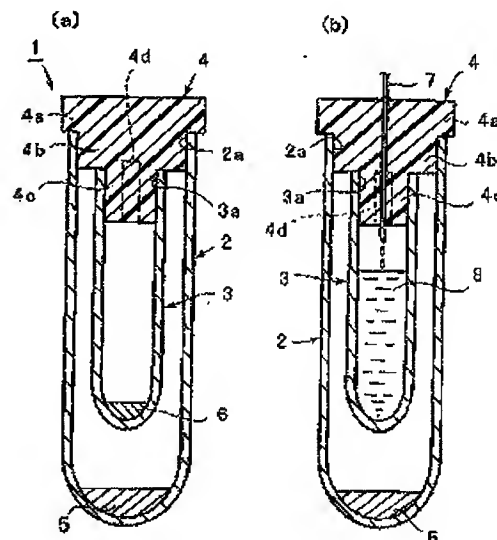
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞機能測定容器及び細胞機能測定方法

(57) 【要約】

【課題】 血液試料の採取から、コントロール試料及び測定対象試料を単一の容器で容易にかつ効率よく調製し得る細胞機能測定容器を得る。

【解決手段】 第1の管状容器2内に第2の管状容器3が配置されており、栓体4により、第1、第2の管状容器2、3の上端開口2a、3aが閉成されており、第2の管状容器3と栓体4とにより連通機構が構成されており、血液試料8を第2の管状容器3内に導入した後、上記連通機構を利用して第1、第2の管状容器2、3内を連通させ、その状態で上下転倒することにより、血液試料の一部が第2の管状容器3内から第1、第2の管状容器2、3間の隙間に流入され、該隙間において血液試料中の生理活性物質の産生を誘導する刺激物質5と血液試料とが反応される、細胞機能測定容器。



(2)

特開2001-194365

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血液試料の細胞機能を測定するための細胞機能測定容器であって、

上端に開口を有し、かつ有底の第1の管状容器と、

第1の管状容器内に挿入されており、上端に開口を有し、かつ有底であり、血液を採取するための第2の管状容器と、

第1、第2の管状容器を閉成している栓体と、

第1、第2の管状容器間の隙間に収納されており、血液試料と反応して生体活性物質の産生を誘導する刺激物質とを備え、

前記第2の管状容器内に導かれた血液試料を前記第1、第2の管状容器間の隙間に分注することを可能とする連通機構をさらに備えることを特徴とする、細胞機能測定容器。

【請求項2】 請求項1に記載の細胞機能測定容器を用いた細胞機能測定方法であって、

第2の管状容器内に血液試料を採取する工程と、

前記連通機構を利用して第2の管状容器内に採取された血液試料の少なくとも一部を第1、第2の管状容器間の隙間に流入させて、第1の管状容器と第2の管状容器に血液試料を分注すると共に、第1の管状容器と第2の管状容器との間の隙間において血液試料を刺激物質と反応させる工程とを備えることを特徴とする、細胞機能測定方法。

【請求項3】 前記連通機構が、前記栓体と、第2の管状容器の内面において、上方開口端から下方に延びるように形成された第1の溝とで構成されており、

前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連わられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びる第2の溝が形成されており、かつ第1、第2の管状容器の隙間と第2の溝とを連通するように大径挿入部の下面に第3の溝が形成されており、第1の溝の下端は、小径挿入部が第2の管状容器に挿入された際に、小径挿入部の下端よりも下方に位置されている。請求項1に記載の細胞機能測定容器。

【請求項4】 前記連通機構が、栓体と、第2の管状容器の内面において、上方開口端から下方に延びるように形成された第1の溝とで構成されており、

前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連わられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びる第2の溝が形成されており、かつ第2の溝の上端が、第1、第2の管状容器の隙間と第2の溝とを連通するように大径挿入部の下面に形成された第3の溝に連わられており、第1の溝の下端は、小径挿入部が第2の管状容器に挿入された際に、小径挿入部の下

2

端よりも下方に位置されており、

前記連通機構を利用して血液試料の一部を第2の管状容器内から第1、第2の管状容器間の隙間に流入させる工程が、

栓体を回転させ、栓体の第2の溝を第2の管状容器の第1の溝と重なり合わせ、それによって第1、第2の管状容器間を連通させる工程と、

前記栓体により閉成されている第1、第2の管状容器を上下逆転し、血液試料を第2の管状容器内から第1の管状容器内に流入させる工程と、

上下逆転された細胞機能測定容器を再度上下逆転し、第1の管状容器と第2の管状容器に血液試料を分注すると共に、第1の管状容器と第2の管状容器との間の隙間において血液試料を刺激物質と反応させる工程とを備えることを特徴とする、請求項2に記載の細胞機能測定方法。

【請求項5】 前記連通機構が、前記栓体と、第2の管状容器の上方開口端に形成された切り欠き部で構成されており、

前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連わられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びかつ下方に連続した溝が形成されている。請求項1に記載の細胞機能測定容器。

【請求項6】 前記連通機構が、栓体と、第2の管状容器の上方開口端に形成された切り欠き部で構成されており、

前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連わられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びかつ下方に連続した溝が形成されており、

前記連通機構を利用して血液試料の一部を第2の管状容器内から第1、第2の管状容器間の隙間に流入させる工程が、

栓体を回転させ、栓体の溝を第2の管状容器の切り欠き部と重なり合わせ、それによって第1、第2の管状容器間を連通させる工程と、

前記栓体により閉成されている第1、第2の管状容器を上下逆転し、血液試料を第2の管状容器内から第1の管状容器内に流入させる工程と、

上下逆転された細胞機能測定容器を再度上下逆転し、第1の管状容器と第2の管状容器に血液試料を分注すると共に、第1の管状容器と第2の管状容器との間の隙間において血液試料を刺激物質と反応させる工程とを備えることを特徴とする、請求項2に記載の細胞機能測定方法。

【請求項7】 前記刺激物質がエンドトキシンである、

(3)

特開2001-194365

3

4

請求項1、3または5に記載の細胞機能測定容器。

【請求項8】 第1の管状容器の内面及び／又は第2の管状容器の外面に、前記刺激物質が物理的若しくは化学的に固定化されていることを特徴とする、請求項1、3、5または7に記載の細胞機能測定容器。

【請求項9】 前記連通機構により第1の管状容器と第2の管状容器の間を移動することができない大きさの担体に、前記刺激物質が物理的若しくは化学的に固定化されていることを特徴とする、請求項1、3、5または7に記載の細胞機能測定容器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血液試料の採取から血液試料を試薬等と反応させて得られた結果を測定するまでの工程を行い得る細胞機能測定容器並びに該細胞機能測定容器を用いた細胞機能測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】顆粒球、単球、マクロファージ、リンパ球等の白血球は、血液中あるいは各臓器もしくは器官における炎症反応や免疫反応などの種々の生体防御反応において様々な役割を担っている。これらの細胞は、感染症；肝炎や腎炎などの炎症性疾患；慢性関節リウマチや喘息などの免疫・アレルギー性疾患；癌などの種々の病態において重要な働きをしており、病態の変動と共にこれらの細胞の機能が抑制されたり、増強されたりすることが知られている。

【0003】また、これらの疾患の治療に、抗炎症剤、免疫抑制剤、免疫増強剤、抗癌剤等の種々の薬剤が用いられており、その際にもこれらの細胞の機能が抑制されたり、または増強されたりすることも知られている。そのため、各種疾患の病態や薬剤の効果あるいは副作用を把握することにより、治療方針を決定したり、薬剤の投与量やタイミングを決定したりするために、これらの細胞の機能を調べることが重要である。

【0004】従来、病院の検査室や検査センターでは、上記のような理由から、このような細胞機能を測定するために、顆粒球貪食機能試験、顆粒球殺菌能（活性酸素産生能）試験、リンパ球幼若化試験等が行われてきた。また、最近では、フローサイトメトリ装置と各種免疫担当細胞表面抗原に対する蛍光標識モノクローナル抗体とを用いた表面抗原試験等が行われるようになってきた。しかしながら、従来の試験法には、細胞分離、細胞培養及び顕微鏡測定等の特殊な技術が要求され、測定に時間がかかり、R1施設やフローサイトメーターなどの高価な装置が必要であった。

【0005】また、血液中の単球やこの単球が組織に出て分化、成熟したマクロファージは、食作用を介した異物排除や、抗原提示を介した免疫の成立に関与し、また、サイトカイン、プロスタグランジンなどの種々の生理活性物質を分泌することによって、炎症反応や免疫反

応を調節するなど、非常に多彩な機能を持っている。そのため、単球やマクロファージは、顆粒球やリンパ球と同様に、種々の病態においても重要な働きをしており、これらの細胞の機能を調べることは非常に重要である。特に、感染症などでは、単球やマクロファージは顆粒球やリンパ球と異なり、細胞数はあまり変動せず、その機能の増幅が主体であり、細胞機能変化を測定することはより重要である（「マクロファージ」徳永 徹著、講談社サイエンティフィック1986年初版発行）。

10 【0006】腫瘍壊死因子 α （以下、TNF- α という）、インターロイキン-1 β （以下、IL-1 β という）、インターロイキン-6（以下、IL-6という）は、モノカインと呼ばれ、血液細胞では主に、単球やマクロファージを含む白血球によって産生され、種々の炎症反応や免疫反応に関与するサイトカインである。

【0007】これまで、血液や血液から分離した白血球からの上記サイトカイン産生機能を調べる種々の方法が報告されている。例えば、特開平2-196961号公報、特開平3-285692号公報には、血液にリポ多糖（LPS）やレクチンを反応させ、産生誘導されたTNF- α やIL-1 β などのサイトカインを測定する方法が開示されている。また、特開平6-209992号公報、特開平7-67955号公報には、特定の表面粗さを有する高分子材料や特定の化学構造を有する高分子材料と血液とを接触させ、TNF- α の産生を誘導する方法が開示されている。また、特開平7-299732号公報、特開平7-151752号公報には、特定の表面粗さを有する高分子材料と血液とを接触させ、TNF- α やIL-1 β の産生量を測定する生体反応検査方法が開示されている。また、特表平7-500905号公報には、ヒト末梢白血球からのTNF- α やIL-1 β などのサイトカインの産生誘導量を測定することによって、試験物質の免疫活性能力を測定する方法が開示されている。

【0008】しかしながら、従来、病院の検査室や検査センターで行われてきた細胞機能測定方法や上記の公開特許公報に開示の方法には、以下のような問題点があった。すなわち、これらの試験は、いずれも被験者から注射器で血液を採血後、ピペティングなどの用手法の手段で血液を種々の反応容器に移し変える操作、白血球などを分離するための細胞分離、並びに機能測定のための細胞培養等の特殊な操作が必要であった。そのため、検査従事者が血液に触れ、肝炎、エイズなどの種々の感染症に感染する危険性があった。また、これらの操作中に、血液試料中に種々の雑菌や埃などが混入する恐れがあり、これらの汚染物あるいは操作による物理的刺激によって、血液中の細胞が不必要に刺激され、測定結果に悪影響を及ぼす恐れがあった。

【0009】また、血液を採取し、特定の反応容器内において、白血球からのサイトカイン、特にTNF- α や

(4)

特開2001-194365

5

IL-1 β の産生量を測定する従来法では、例えば注射器のような血液採取器や反応容器中に元々、グラム陰性菌由来のLPSなどのエンドトキシンが混入していることがあった。エンドトキシンは、極微量で白血球からTNF- α 及びIL-1 β の産生を誘導するため、例えば、製造工程での微塵の埃の混入や使用する洗浄水からの汚染により、少量のエンドトキシンが上記血液採取器や反応容器に混入した場合、信頼できる測定結果を得ることは不可能であった。

【0010】上述した問題のため、従来よりも、操作が簡単で危険性がなく、精度の良い細胞機能測定方法が望まれている。血液試料を採取し、細胞機能を測定するための細胞機能測定容器の一例が、WO98/07031号公報に記載されている。ここでは、血液細胞が産生する生理活性物質、例えばサイトカイン、TNF- α やIL-1 β などを測定するための細胞機能測定用キットが開示されている。この細胞測定用キットでは、上記生理活性物質の産生を誘導する材料、例えばエンドトキシン含量が血液細胞から生理活性物質を産生しない量とされているコントロールの第1の細胞機能測定用容器と、

エンドトキシンが収納された第2の細胞機能測定用容器とが備えられている。

【0011】そのため、第1の細胞機能測定用容器及び第2の細胞機能測定用容器のいずれにも、血液を採取し、反応させ、測定を行わねばならなかった。従って、操作が煩雑であった。

【0012】また、従来、血液試料の分析に際しては、一般に、採血管が用いられており、採血管により血液試料を採取し、しかる後血清や血漿などを得た後に、測定のための反応容器に血清や血漿などの血液試料を分注し、分析装置等において分析する方法が一般的に用いられている。従って、血液試料の採取に採血管を用い、分析装置に血液試料を供給するために測定用の管状容器等が用いられていた。あるいは、上記のように、血液試料を他の物質と反応させて、その反応結果を測定する場合には、採血管から血漿や血清を取り出し、上記反応物質が収納された反応容器に血清や血漿等を分注し、反応させる必要があった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消し、コントロール及び測定試料を1つの容器で調製することができ、かつ血液試料の採取から反応結果を得るまでの一連の工程を単一の容器で行うことを可能とする細胞機能測定容器及び細胞機能測定方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明の広い局面によれば、血液試料の細胞機能を測定するための細胞機能測定容器であって、上端に開口を有し、かつ有底の第1の管状容器と、第1の管状容器内に挿入されており、上端に

6

開口を有しかつ有底であり、血液を採取するための第2の管状容器と、第1、第2の管状容器を開成している栓体と、第1、第2の管状容器間の隙間に収納されており、血液試料と反応して生理活性物質の産生を誘導する刺激物質とを備え、前記第2の管状容器内に導かれた血液試料を前記第1、第2の管状容器間の隙間に分注することを可能とする連通機構をさらに備えることを特徴とする、細胞機能測定容器が提供される。

【0015】本発明の別の広い局面によれば、本発明に係る細胞機能測定容器を用いた細胞機能測定方法が提供される。この細胞機能測定方法は、第2の管状容器内に血液試料を採取する工程と、前記連通機構を利用して第2の管状容器内に採取された血液試料の少なくとも一部を第1、第2の管状容器間の隙間に流入させて、第1の管状容器と第2の管状容器に血液試料を分離すると共に、第1の管状容器と第2の管状容器との間の隙間において血液試料を刺激物質と反応させる工程とを備える。

【0016】本発明に係る細胞機能測定容器の特定の局面では、前記連通機構が、栓体と、第2の管状容器の内面において、上方開口端から下方に延びるように形成された第1の溝とで構成されており、前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連わられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びる第2の溝が形成されており、かつ第1、第2の管状容器の隙間と第2の溝とを連通するように大径挿入部の下面に第3の溝が形成されており、第1の溝の下端は、小径挿入部が第2の管状容器に挿入された際に、小径挿入部の下端よりも下方に位置されている。

【0017】本発明に係る細胞機能測定方法の特定の局面では、連通機構が、栓体と、第2の管状容器の内面において、上方開口端から下方に延びるように形成された第1の溝とで構成されており、前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連わられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面上下方向に延びる第2の溝が形成されており、かつ第2の溝の上端が、第1、第2の管状容器の隙間と第2の溝とを連通するように大径挿入部の下面に形成された第3の溝に連わられており、第1の溝の下端は、小径挿入部が第2の管状容器に挿入された際に、小径挿入部の下端よりも下方に位置されている。そして、前記連通機構を利用して血液試料の一部を第2の管状容器内から第1、第2の管状容器間の隙間に流入させる工程が、栓体を回転させ、栓体の第2の溝を第2の管状容器の第1の溝と重なり合わせ、それによって第1、第2の管状容器間を連通させる工程と、前記栓体により閉成されている第1、第2の管状容器を上下逆転し、血液試料を第2の管状容器内から第1の管状容器内

(5)

特開2001-194365

7

に流入させる工程と、上下逆転された細胞機能測定容器を再度上下逆転し、第1の管状容器と第2の管状容器に血液試料を分離すると共に、第1の管状容器と第2の管状容器との間の隙間において血液試料を刺激物質と反応させる工程とを備える。

【0018】また、本発明に係る細胞機能測定容器の特定の局面では、前記連通機構が、前記栓体と、第2の管状容器の上方開口端に形成された切り欠き部で構成されており、前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連ねられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びかつ下方向に連続した溝が形成されている。

【0019】本発明に係る細胞機能測定方法の特定の局面では、前記連通機構が、栓体と、第2の管状容器の上方開口端に形成された切り欠き部で構成されており、前記栓体は、第1の管状容器の上端開口を液密的に閉成する大径挿入部と、大径挿入部の下端に連ねられており、かつ第2の管状容器の上端開口を液密的に閉成するための小径挿入部とを有し、小径挿入部の外周面において上下方向に延びかつ下方向に連続した溝が形成されている。そして、前記連通機構を利用して血液試料の一部を第2の管状容器内から第1、第2の管状容器間の隙間に流入させる工程が、栓体を回転させ、栓体の溝を第2の管状容器の切り欠き部と重なり合わせ、それによって第1、第2の管状容器間を連通させる工程と、前記栓体により閉成されている第1、第2の管状容器を上下逆転し、血液試料を第2の管状容器内から第1の管状容器内に流入させる工程と、上下逆転された細胞機能測定容器を再度上下逆転し、第1の管状容器と第2の管状容器に血液試料を分離すると共に、第1の管状容器と第2の管状容器との間の隙間において血液試料を刺激物質と反応させる工程とを備える。

【0020】本発明に係る細胞機能測定容器の特定の局面では、上記刺激物質としてエンドトキシンが用いられ、さらに特定の局面では、第1の管状容器の内面及び／又は第2の管状容器の外面に、刺激物質が物理的若しくは化学的に固定化されているか、連通機構により第1の管状容器と第2の管状容器の間を移動することができない大きさの担体に、刺激物質が物理的若しくは化学的に固定化されている。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しつつ本発明に係る細胞機能測定容器及び細胞機能測定方法の実施形態につき説明する。

【0022】図1(a)は、本発明の一実施形態に係る細胞機能測定容器を示す縦断面図であり、図3はその外観を示す斜視図である。図4(a)は、栓体4と第2の管状容器3とを分離して示す斜視図であり、図4(b)

8

は、栓体を下方から見た斜視図であり、図5は第1の管状容器2を示す斜視図である。

【0023】細胞機能測定容器1は、第1の管状容器2と、第1の管状容器2内に挿入されている第2の管状容器3と、弾性材料よりなる栓体4とを備える。第1の管状容器2は、上端に開口2aを有する。第1の管状容器2は、有底であり、略円筒状の形状を有する。第1の管状容器2は、合成樹脂やガラスなどの適宜の材料で構成することができるが、後述の上下転回操作等を考慮すると、破損を防止するためには、合成樹脂を用いて構成することが好ましい。また、第1の管状容器2は、外部から反応結果を目視により確認したり、分光光度計などを用いて測定するためには、透明性を有するものであることが望ましい。好ましくは、透明性に優れ、かつ水蒸気バリア性に優れたポリプロピレンが用いられる。

【0024】第2の管状容器3は、第1の管状容器2よりも小径の略円筒状の有底の管状体により構成されている。第2の管状容器3は、上端に開口3aを有する。第2の管状容器3は、ガラスあるいは合成樹脂などの適宜の材料で構成することができるが、破損を防止するためには、合成樹脂からなるものが好ましい。より好ましくは、ガスバリア性に優れたポリエチレンテレフタレートが用いられる。

【0025】また、第2の管状容器3についても、外部から内部状態を観察することを可能とするためには透明であることが望ましい。栓体4は、合成ゴムあるいは天然ゴムなどの弾性材料からなり、上端に持ち手4aを有する。持ち手4aは、第1の管状容器2の外径よりも大きな径を有するように構成されており、それによって手で栓体4を回転したり、引き抜く操作を容易に行うことができるように構成されている。持ち手4aの下端には、大径挿入部4bが連ねられており、大径挿入部4bの下端には、小径挿入部4cが連ねられている。大径挿入部4bは、第1の管状容器2の開口2aに圧入されるような径を有するように構成されており、小径挿入部4cは第2の管状容器3の開口3aに圧入し得るように構成されている。すなわち、第1の管状容器2及び第2の管状容器3の開口2a、3aを閉成するように、栓体4が取り付けられている。

【0026】図4(a)から明らかなように、第2の管状容器3の内面には、開口3aから下方に延びるように、第1の溝3bが形成されている。他方、栓体4の小径挿入部4cには、上下方向に延びる第2の溝4dが形成されている。なお、第2の溝4dの下端は小径挿入部4cの下端には至らないように構成されている。また、図4(b)に示すように、第2の溝4dの上端に連なるように、大径挿入部4bの下面には、第2の管状容器3の外周面よりも外側に延びる第3の溝4eが形成されている。図1においては、第2の溝4dが破線で示されている。第2の溝4dについては、小径挿入部4cが第2

(6)

特開2001-194365

9

10

の管状容器3の内周面に圧接されているため変形している。図1に示す状態では、第1の溝3bは周方向において第2の溝4dと重なり合わない位置に配置されているため、図示されていない。

【0027】従って、図1に示す初期状態では、第2の管状容器3内と、第1の管状容器2内との間は液密的に遮断されている。なお、上記第1の溝3bの下端は、図1に示す状態、すなわち小径挿入部4cが第2の管状容器3内に挿入された状態において、小径挿入部4cの下端よりも下方に位置されている。

【0028】本実施例では、連通機構が、上記第1の溝3bと、栓体4とで構成されているが、本発明においては、第1の管状容器内に導かれた血液試料を、第1、第2の管状容器間の隙間に分注することを可能とする適宜の連通機構を用いることができ、特に本実施例の構造に限定されるものではない。

【0029】例えば、図6に示したように、連通機構が、第2の管状容器3の上方開口端に形成された切り欠き部3cと、栓体4の小径挿入部4cの外周面において上下方向に延びており、かつ下方向に連続している溝4fとで構成されていてもよい。

【0030】本実施形態の細胞機能測定容器1では、図1に示すように、第1の管状容器2と第2の管状容器3との間の隙間に、すなわち第1の管状容器2内に刺激物質5が収納されている。刺激物質5としては、測定する生理活性物質の種類に応じて、血液試料と反応して該生理活性物質の産生を誘導する適宜の刺激物質が用いられる。本実施形態では、刺激物質5としてエンドトキシンが収納されている。

【0031】また、第2の管状容器3内には、血液抗凝固剤6が収納されている。血液抗凝固剤6としては、ヘパリン、クエン酸化合物、シュウ酸化合物などを用いることができ、特に、ヘパリンナトリウムが、細胞の生物学的反応を阻害しないので好ましい。また、第1の管状容器2内には、刺激物質5として、トロンビン等の血液凝固剤が収容されていてもよい。

【0032】次に、刺激物質5としてエンドトキシンを用い、サイトカインの産生を誘導し、サイトカインを測定する細胞機能測定方法を図1及び図2を参照して説明する。

【0033】まず、図1(b)に示すように、採血針7を栓体4に突き刺し、血液試料8を第2の管状容器3内に導入する。この場合、第2の管状容器3内が減圧にされている場合には、血液試料8をより速やかに第2の管状容器3内に導入することができる。なお、第2の管状容器3内だけでなく、第1の管状容器2内も減圧されている。

【0034】上記のようにして、第2の管状容器3内に血液試料8を採取する。第2の管状容器3内には、血液抗凝固剤6が収納されているので、血液試料8は凝固し

ない。

【0035】次に、栓体4を軸方向まわりに回転し、第2の管状容器3に設けられている第1の溝3bと、栓体4に設けられている第2の溝4dとを重なり合わせる。しかる後、細胞機能測定容器1全体を図2(a)に示すように上下転倒する。この場合、第1の溝3bと第2の溝4dとが対向して流路が形成されている。この流路が第3の溝4eに連なっているため、第2の管状容器3内と第1の管状容器2内とが連通する。従って、血液試料が第2の管状容器3内から上記流路を通り第1の管状容器2側に流入する。その結果、図2(a)に示されているように、血液試料4の液面は、第1の管状容器2と第2の管状容器3内とで同一となる。

【0036】次に、再度細胞機能測定容器1を上下転倒する(図2(b))。その結果、第1の管状容器2内には、血液試料8が残存し、第1の管状容器2と第2の管状容器3との間の隙間にも血液試料8が存在する。もっとも、第1の管状容器2と第2の管状容器3との間に収納されている血液試料8は、上述した刺激物質5と接触される。従って、血液試料中において、刺激物質5すなわちエンドトキシンによりサイトカインの産生が誘導される。

【0037】従って、第2の管状容器3内にコントロールとしての血液試料を採取することができ、第1の管状容器2内に測定対象試料が採取される。上記のように、本実施形態の細胞機能測定容器1を用いれば、単一の細胞機能測定容器で、血液試料の採取から細胞機能の調製までを効率よく行うことができる。

【0038】なお、上記実施形態では、刺激物質5としてエンドトキシンを用い、生理活性物質としてサイトカインを測定する方法を例にとり説明したが、本発明に係る細胞機能測定容器は様々な細胞機能測定方法に用いることができる。

【0039】すなわち、測定対象物質としての生理活性物質については、サイトカインに限定されず、例えば、プロスタグランジンなどのアラキドン酸代謝物、活性酸素種、可溶性接着因子、可溶性レセプタ、顆粒内酵素などを挙げることができる。

【0040】また、生理活性物質の産生を誘導する刺激物質についても、生理活性の種類に応じて適宜選択することができる。このような刺激物質の例としては、エンドトキシンの他、BCG死菌やコリネバクテリウム属などの種々の微生物；合成リポドA；ビランコポリマー；レクチン（フィトヘマグルチニン、コンカナバリンA、ボークウィードマイトゲン等）；OK432（ビシバニール）；PSK（クレステン）；レンチナン；ザイモザン；LPS（リポポリサッカライド）；カルシウムイオンフォア；ホルホルエステル；免疫グロブリン固定化担体；ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン（FMILP）などのホルミルペプチド；種々のサイトカイン

11

などが挙げられる。

【0041】また、喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、消化管アレルギー、寄生虫アレルギーなどのアレルゲン検査に用いられる特定抗原（例えば、ハウスダスト；ダニ抗原；ブタクサ花粉抽出物、スギ花粉抽出物、イネ抽出物などの種々の花粉抗原；真菌抗原、アスカリス抽出物などの寄生虫抗原；卵白アルブミン、小麦、大豆、エビ、カニ、肉類などの食物抗原；ハチ毒など）も用いられる。

【0042】また、上記に示した生体活性物質の産生を誘導する材料を種々の天然、合成高分子材料に公知の固定化方法（共有結合法、物理吸着法など）によって固定化した材料なども挙げられる。

【0043】上記生体活性物質の産生を誘導する材料の形状としては、特に限定されず、例えば、液状、粒子状などが挙げられる。また、担体に固定化されていてもよい。上記液状の場合は、通常、上記生体活性物質の産生を誘導する材料を、希釈液として、例えば、リン酸緩衝液、ハンクス緩衝液などの緩衝液やMEM、RPMI-1640等の通常の培地、生理食塩液（例えば、大塚製薬社製）、注射用水（例えば、大塚製薬社製）などで希釈して用いる。

【0044】上記生体活性物質の産生を誘導する材料の反応容器中の存在状態は、固体状であってもよく、また、液体状であってもよい。生体活性物質の産生を誘導する材料が水溶性材料の場合、容器の内壁面に塗布、または添加された後、粉末状にされてもよい。例えば、注射用水を用いて生体活性物質の産生を誘導する材料を希釈した場合は、生体活性物質の産生を誘導する材料を容器に入れた後、乾固した方が好ましい。生体活性物質の産生を誘導する材料が水不溶性の材料の場合には、上記生体活性物質の産生を誘導する材料の表面に気泡が残ると、転倒混和等により血液と接触させる際に過度の溶血を引き起こし、測定系に影響するおそれがあるため、水不溶性材料は、例えば、上記のような希釈液に浸しておくのが好ましい。

【0045】担体に生体活性物質の産生を誘導する材料が固定化されて用いられる場合、固定化する担体が水溶性材料の場合は、容器の内壁面に塗布、あるいは添加した後、粉末状にしてもよい。担体が水不溶性材料の場合は、材料の表面に気泡が残ると、過度の溶血を引き起こし、測定系に影響するおそれがあるため、例えば、上記のような希釈液に浸しておくのが好ましい。

【0046】上記刺激物質は、より好ましくは第1の管状容器の内面若しくは第2の管状容器の外表面あるいはこれらの両面に、物理的若しくは化学的に固定化される。刺激物質を容器表面に物理的に固定化する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、エンドトキシンを炭酸緩衝液（pH9.5）に10mg/mL濃度で溶解させたものを、固定化させる容器表面に1mL添加し、

(7)

特開2001-194365

12

37℃で18時間程度静置した後、エンドトキシンフリー水で洗浄する方法等が挙げられる。

【0047】また、上記刺激物質は、前記連通機構により第1の管状容器と第2の管状容器の間を移動することができない大きさの担体に、物理的若しくは化学的に固定化されていてもよい。上記担体としては、上記連通機構を構成する溝や切り欠き部の大きさよりも大きなものが用いられ、その素材としては合成樹脂等が挙げられる。このような担体に刺激物質を物理的に固定化する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、エンドトキシンを炭酸緩衝液（pH9.5）に10mg/mL濃度で溶解させたもの10mLを、直径約2mmのポリスチレンビーズ1gと混和し、37℃で18時間程度攪拌した後、エンドトキシンフリー水で洗浄する方法等が挙げられる。

【0048】生体活性物質の産生を誘導する材料の反応容器中への添加量は、生体活性物質の産生を誘導する材料の種類によって適宜最適濃度を設定することが好ましい。また、第1の管状容器2内には、上記生体活性物質を測定するための測定試薬が収納されていてもよく、このような測定試薬としては、例えば上記生体活性物質に対するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、ヘルオキシンターゼ、アルカリホスホターゼなどの酵素及びそれぞれの酵素の発色基質などを利用した酵素免疫測定試薬が挙げられる。

【0049】上記実施形態では、第1の管状容器2内に刺激物質5を収納していたが、刺激物質5に加えて、刺激物質により産生された生体活性物質と反応する測定試薬を収納し、該測定試薬を利用して生体活性物質濃度を測定するように構成してもよい。

【0050】

【発明の効果】本発明に係る細胞機能測定容器では、第1の管状容器に、血液を採取するための第2の管状容器が挿入されており、第1、第2の管状容器間の隙間に上記刺激物質が収納されており、上記連通機構を利用することにより、第2の管状容器内に導かれた血液試料の一部が第1、第2の管状容器間の隙間に移動されるので、血液試料を第2の管状容器内と、第1、第2の管状容器間の隙間とに分能することができる。また、第1、第2の管状容器間の隙間においては上記刺激物質と血液試料との反応により生体活性物質が産生される。従って、第2の管状容器内の血液試料をコントロールとして、第1の管状容器内において産生された生体活性物質を測定することが可能となる。

【0051】すなわち、従来の細胞機能測定容器や細胞機能測定容器では、コントロール試料と測定試料とを調製するのに、少なくとも2本の容器を必要であったのに対し、本発明に係る細胞機能測定容器では、1本の細胞機能測定容器を用いるだけで、血液試料の採取からコントロール試料及び測定対象試料の調製までを容易にかつ

50

(8)

特開2001-194365

13

効率よく行うことができる。

【0052】本発明に係る細胞機能測定容器の特定の局面では、連通機構が、第2の管状容器の側面に形成された第1の溝と、栓体の小径挿入部の外周面に設けられた第2の溝及び大径挿入部の下面に設けられた第3の溝とにより構成されているので、第2の管状容器内に血液試料を採取した後、第2の管状容器に用いられた第1の溝と、栓体の小径挿入部の外周面に設けられた第2の溝とを重なり合うようにして流路を形成し、上下転倒するだけで、血液試料を第2の管状容器内と、第1、第2の管状容器間の隙間とに分離することができる。また、本発明に係る細胞機能測定容器の特定の局面では、追通機構が、栓体の小径挿入部の外周面に設けられた溝と、第2の管状容器の上方開口端に形成された切り欠き部と構成されているので、第2の管状容器内に血液試料を採取した後、第2の管状容器に形成された切り欠き部と、栓体の小径挿入部の外周面に設けられた溝とを重なり合うようにして流路を形成し、上下転倒するだけで、血液試料を第2の管状容器内と、第1、第2の管状容器間の隙間とに分離することができる。従って、第2の管状容器内の血液試料をコントロールとし、第1の管状容器内において刺激物質と反応された血液試料を測定対象試料として、細胞機能の測定を容易に行うことができる。

【0053】本発明に係る細胞機能測定方法では、本発明に係る細胞機能測定容器において、追通機構を利用して、第2の管状容器に導かれた血液を、第2の管状容器内と、第1、第2の管状容器間とに分離することができ、第1、第2の管状容器間の隙間において刺激物質と血液試料とが反応して生体活性物質が産生される。従って、細胞機能の特定を1つの細胞機能測定容器を用いて行うことができる。

【0054】また、本発明に係る細胞機能測定方法において、連通機構が、第2の管状容器の内面に形成された第1の溝と、栓体に形成された第2、第3の溝とにより構成されている場合には、第2の管状容器内に血液試料を採取し、栓体を回転させて、栓体の第2の溝と管状容器の第1の溝とを重なり合わせ、それによって第1、第2の管状容器間を連通し、しかる後細胞機能測定容器全体を上下逆転し、再度上下逆転された細胞機能測定容器を逆転させるだけで、血液試料を第1の管状容器と第2の管状容器内に分離することができると共に、第1、第2の管状容器間の隙間において、血液試料を刺激物質と反応させることができる。また、連通機構が、第2の管状容器の上方開口端に形成された切り欠き部と、栓体の小径挿入部の外周面に設けられた溝とにより構成されている場合には、第2の管状容器内に血液試料を採取し、栓体を回転させて、栓体の溝と管状容器の切り欠き部とを重なり合わせ、それによって第1、第2の管状容器間を連通し、しかる後細胞機能測定容器全体を上下逆転し、再度上下逆転された細胞機能測定容器を逆転させる

14

だけで、血液試料を第1の管状容器と第2の管状容器内に分離することができると共に、第1、第2の管状容器間の隙間において、血液試料を刺激物質と反応させることができる。従って、第2の管状容器内のコントロール試料と、第1、第2の管状容器間の隙間において産生された生体活性物質含有測定対象試料とを測定することにより、細胞機能を容易に測定することができる。

【0055】上記刺激物質としてエンドトキシンを用い、細胞機能測定試薬として酵素免疫測定試薬を用いた場合、エンドトキシンによりサイトカインの産生を誘導することができる。血液試料の様々な細胞機能を容易に測定することができる。

【0056】また、刺激物質が、第1の管状容器の内面及び／又は第2の管状容器の外周面、あるいは連通機構により第1の管状容器と第2の管状容器の間を移動することができない大きさの担体に、物理的若しくは化学的に固定化されている場合には、分注操作の際に、刺激物質が第2の管状容器内に混入する恐れがなく、血液試料の細胞機能をより高い精度で測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】(a)及び(b)は、本発明の一実施形態に係る細胞機能測定容器を用いた細胞機能測定方法を説明するための各縦断面図。

【図2】(a)及び(b)は、本発明の一実施形態に係る細胞機能測定容器を用いた細胞機能測定方法を説明するための各縦断面図。

【図3】本発明の一実施形態に係る細胞機能測定容器の外観を示す斜視図。

【図4】(a)及び(b)は、本発明の一実施形態に係る細胞機能測定容器の第2の管状容器と栓体との関係を説明するための分解斜視図及び栓体を下方から見た斜視図。

【図5】本発明の一実施形態に用いられる細胞機能測定容器の第1の管状容器を示す斜視図。

【図6】(a)及び(b)は、本発明の別の実施形態に係る細胞機能測定容器の第2の管状容器と栓体との関係を説明するための分解斜視図及び栓体を下方から見た斜視図。

【符号の説明】

- 1…細胞機能測定容器
- 2…第1の管状容器
- 2a…開口
- 3…第2の管状容器
- 3a…開口
- 3b…第1の溝
- 3c…切り欠き部
- 4…栓体
- 4a…持ち手
- 4b…大径挿入部
- 4c…小径挿入部

(9)

特開2001-194365

15

16

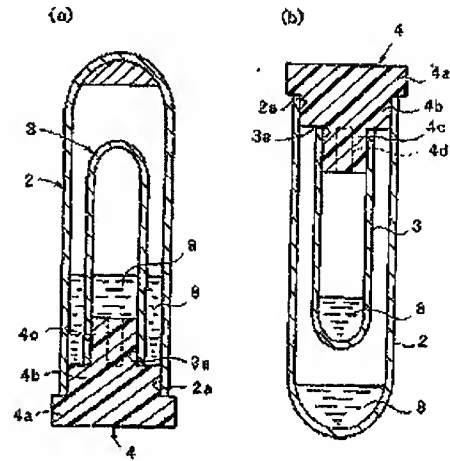
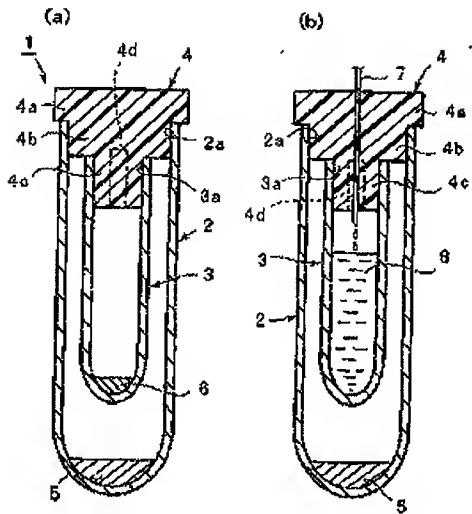
4 d...第2の溝
4 e...第3の溝
4 f...溝
5...刺激物質

* 6...抗凝固剤
7...採血針
8...血液試料

*

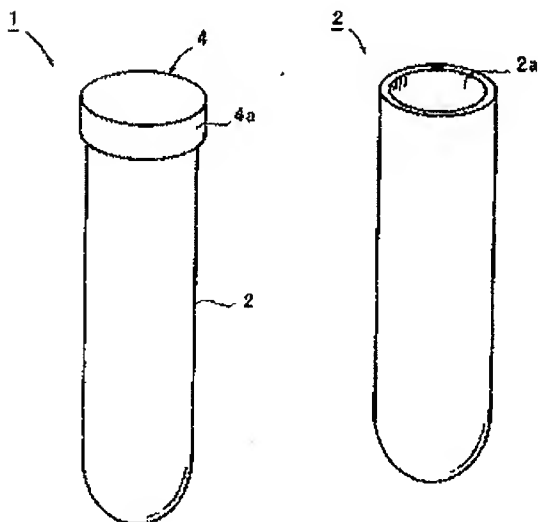
【図1】

【図2】

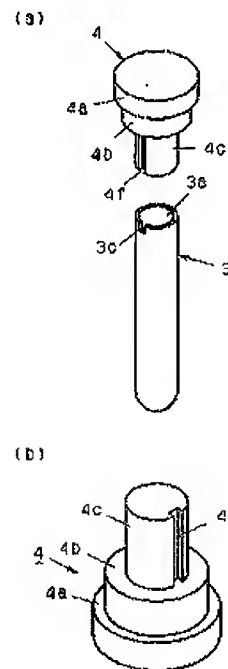


【図3】

【図5】



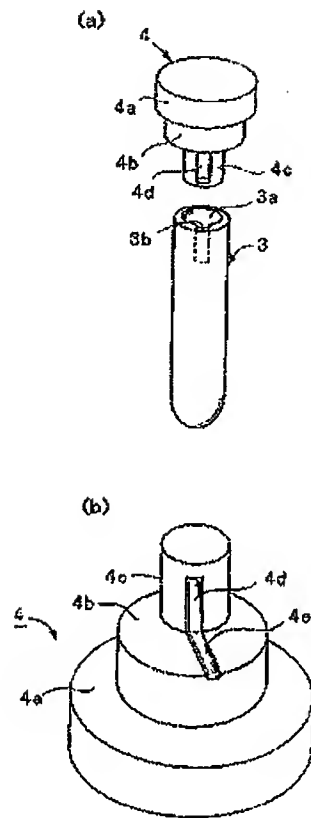
【図6】



(10)

特開2001-194365

【図4】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

ターム(参考)

G 0 1 N 35/02

A 6 1 B 5/14

3 0 0 C

3 0 0 Z

3 0 0 B

3 1 0

F ターム(参考) 2G045 AA01 BB34 BB50 CA25 DA36

HA06 HA09 HA13 HA14

2G058 AA09 CC17 CC18 CC19 EA08

FA03

4C038 KK00 KL01 KL07 KN00 KY01

KY11 TA10 UA03 UA06 UC02

UC04 UD04